

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

HLA-TYPISIERUNG VON BLUTSPUREN

Untersuchungen zur Optimierung des Absorptionstests

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Peter Zaar
aus Berlin

1983

1983#140

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

HLA-TYPISIERUNG VON BLUTSPUREN

Untersuchungen zur Optimierung des Absorptionstests

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Peter Zaar
aus Berlin

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.1983

Für Bärbel,

Lisa und Johannes



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	5
2. PROBLEMSTELLUNG	9
3. MATERIAL UND METHODEN	10
3.1. <u>NIH-Standardtest</u>	10
3.2. <u>Material</u>	11
3.3. <u>Durchführung</u>	15
3.3.1. Lymphozytengewinnung	15
3.3.2. Lymphozytotoxische Reaktion	16
3.3.3. Bewertung	17
4. ABSORPTIONSTEST ZUR UNTERSUCHUNG VON HLA-ANTIGENEN IN BLUTSPUREN	18
4.1. <u>Einstellung des Testsystems - Titration der Testseren</u>	18
4.2. <u>Anlegen von Blutspuren</u>	26
4.3. <u>Durchführung des Absorptionstests</u>	28
4.3.1. Absorptionsphase	28
4.3.2. Testphase	28
4.3.3. Bewertung	30
5. ERGEBNISSE	31
6. DISKUSSION	40
7. UNTERSUCHUNG ZUR EIGNUNG VON (HAPLOTYP- GLEICHEN !) VERWANDTENLYMPHOZYTEN IM ABSORPTIONSTEST AN SPUREN	43
8. ERGEBNISSE	48

9.	DISKUSSION	48
10.	UNTERSUCHUNG ZUR REPRODUZIERBARKEIT VON ERGEBNISSEN AUS DEM ABSORPTIONSTEST AN SPUREN	54
11.	ERGEBNISSE	56
12.	DISKUSSION	58
13.	ZUSAMMENFASSUNG	60
14.	LITERATURVERZEICHNIS	63

1. EINLEITUNG

"Blut ist ein ganz besondrer Saft" so sagt Goethes Mephisto dem Faust, der eben den Pakt mit diesem "besondren Saft" unterzeichnen soll - mag Goethe schon geahnt haben, daß Blut eher die Identität einer Person festlegt als eine Unterschrift ... ?

1901 wurde der erste Schritt zur Differenzierung des menschlichen Blutes mit der Entdeckung der Merkmale des ABO-Systems durch LANDSTEINER getan, der damit die Blutgruppenserologie begründete. Heutzutage kann man das Blut noch wesentlich besser individualisieren, da inzwischen weit mehr als 100 Blutgruppensysteme bekannt sind.

Die Blutgruppenserologie ist Hilfswissenschaft der Transfusions- und Transplantationsmedizin und auch der forensischen Medizin - außerdem spielt sie eine gewisse Rolle in der medizinischen Diagnostik, da schon Assoziationen zwischen Erkrankungen und einzelnen Merkmalen verschiedener Blutgruppensysteme gefunden worden sind.

Die forensische Medizin bedient sich aller sicher nachweisbaren Blutgruppensysteme, sowohl für die Abstammungsbegutachtung als auch für Identitätsun-

tersuchungen.

Die blutgruppenserologische Untersuchung von Blutspuren ist für die Kriminalistik von Bedeutung (SCHLEYER, OEPEN 1977). Bislang kann man an Blutspuren nur die Blutgruppensysteme ABO, Gm, InV und PGM₁ sicher feststellen (HOLZER 1931, COOMB et al. 1956, FIORI 1957, PEREIRA et al. 1969, BRINKMANN 1969, ROTHWELL und SAYCE 1974, JORCH und OEPEN 1977, MISCICHA et al. 1977). Über die Bestimmung von Rh, MN und einiger weiterer erythrozytärer Enzymmerkmale liegen erst wenige Untersuchungen vor (POLITI 1964, MARTIN 1977, SCHWERD 1977, HUMMEL et al. 1977).

Zur besseren Differenzierung von Blutspuren erscheint es deshalb wünschenswert, das Spektrum der bestimmbaren Blutgruppenmerkmale zu erweitern.

Das Blutgruppensystem, das den größten bislang bekannten Polymorphismus und damit auch den größten Nutzen für die Vaterschaftsbegutachtung (MAYR 1977) aufweist, ist das HLA-System. (Übersichten bei BENDER 1978, JOHANNSEN 1979). Bisher sind auf Chromosom Nr. 6 vier verschiedene Genorte mit multipler Allelie bekannt. Mit den Testseren des 8. HLA-Workshops, 1980 (TERASAKI 1980), waren am A-Genort 19, am B-Genort 42, am C-Genort 8 und am DR-Genort 10 HLA-Antigene serologisch nachweisbar.

Die Vererbung der HLA-Merkmale erfolgt en bloc, das heißt, ein Kind erbt einen Haplotypus (Informationsträger für je ein Merkmal des A-, B-, C- und DR-Gen-

orts) von der Mutter und einen vom Vater (Abb. 1).

Genetik des HLA-Systems

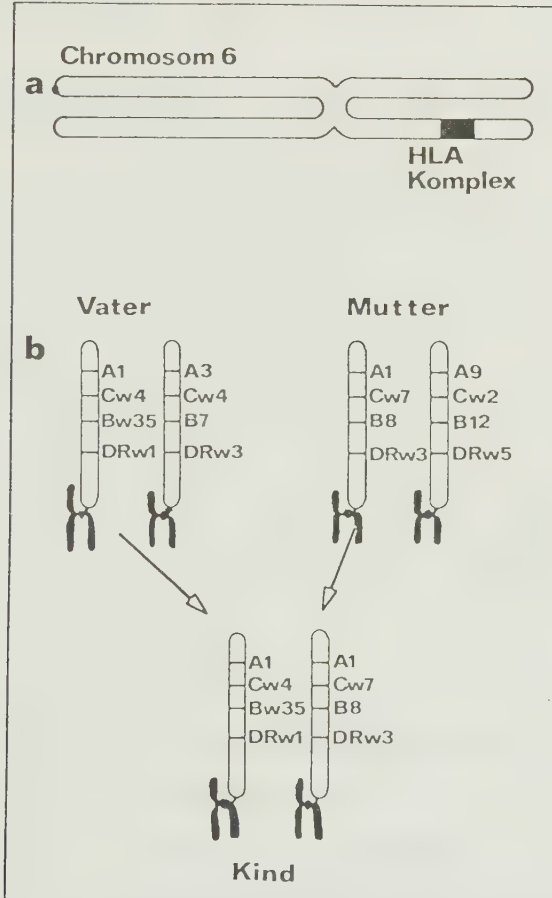


Abb. 1 a) Lokalisation des HLA-Komplexes auf dem Chromosom Nr. 6
b) Vererbungsschema

Ähnlich wie im Rh- und MNSS-System besteht auch im HLA-System eine Imbalanz zwischen den aufgrund der Genfrequenz erwarteten und den tatsächlich beobachteten Haplotypen. Dieses Phänomen wird als Koppelungsungleichgewicht bezeichnet.

Der große Polymorphismus des HLA-Systems erlaubt es für die Praxis der Spurenuntersuchungen sogar, die Identität von Spurenverursacher und Beschuldigtem auch bei dessen Abwesenheit durch Verwandtenuntersuchungen (Eltern und direkte Abkömmlinge) wahrscheinlich zu machen.

RITTNER und WAIYAWUTH veröffentlichten 1974 und 1975 die ersten Untersuchungen über die Bestimmung von HLA-Antigenen in Spuren. Sie brachten alle damals bekannten Antigene dieses Systems in ihre Untersuchungen ein. NEWALL und HODGE griffen vier Jahre später (1979) den Gedanken, HLA-Antigene an Spuren zu bestimmen, auf und entwickelten unabhängig voneinander eine im wesentlichen gleiche Testmethode, mit der sie die Antigene HLA-A1, -A2 und -B7 nachwiesen. 1982 stellten DÖRR und KUTZ mit der gleichen Methode Untersuchungen über die Antigene HLA-A1, -A2, -A3, -A9, -B7 und -B8 an. Sie beschrieben dabei die unterschiedlich gute Eignung sowohl der verschiedenen Anti-HLA-Seren als auch verschiedener Testlymphozyten sowie unterschiedlicher Komplementinkubationszeiten für die angewandte Testmethode. LÖTTERLE veröffentlichte 1982 eine vergleichende Untersuchung über die Absorptions- und Absorptions-Elutionsmethoden, wobei die Absorptionsmethode bessere Ergebnisse brachte.

2. PROBLEMSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit sollten die Untersuchungen von DÖRR und KUTZ (1982) mit dem Ziel fortgesetzt werden, die Methode des Nachweises von HLA-Antigenen in Blutspuren noch weiter zu verbessern. Im einzelnen sollte

- 1) eine Optimierung der Methode durch
 - a) Wahl verschiedener Komplementinkubationszeiten im NIH-Standard-Test (40, 60, 120 Minuten)
 - b) Einsatz von Lymphozyten zweier Spender, die jeweils alle zu untersuchenden Antigene besitzen und
 - c) Verwendung stets mehrerer Anti-HLA-Seren gleicher Spezifität für die Testung eines Antigenserreicht werden
- 2) die Eignung von (haplotypgleichen !) Verwandtenlymphozyten (ersten Grades) als Testzellen untersucht werden
- 3) die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse
 - a) bei Untersuchung am gleichen Tag
 - b) bei Untersuchung an verschiedenen Tagengeprüft werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. NIH-Standard-Test

Die Spender der Blutspuren wurden mit diesem Test HLA-typisiert.

Prinzip des NIH-Standard-Test

Um die zellmembranständigen HLA-Merkmale zu untersuchen, werden diese mit Antiseren bekannter Spezifität zusammengebracht; etwas später fügt man Komplement hinzu. Weisen die Lymphozyten Antigene auf, gegen die die Antiseren gerichtet sind, so werden Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet. Diese können Komplement aktivieren, das seinerseits die Zellmembran irreversibel schädigt (zytotoxische Reaktion): die Barrierefunktion der Membran ist zerstört; Vitalfarbstoffe können nun ins Zellinnere eindringen. Nach entsprechender Anfärbung kann man zytotoxisch veränderte von vitalen Zellen mikroskopisch differenzieren.

3.2. Material

- a) Anti-HLA-Seren
- b) Anti-Lymphozyten-Serum (Positivkontrolle)
- c) AB-Serum, antikörperfrei (Leerwertkontrolle)
- d) Kaninchenkomplement
- e) Hanks-Solution
- f) Dichtegradient zur Isolierung der Lymphozyten
(Lymphoflot, Ficoll-Isopaque)
- g) Eosin 5% in H_2O , partikelfrei
- h) Formaldehyd 37%, filtriert, pH 7,2
- i) Mikroliterspritzen (Hamilton)
- k) Mikrotestplatte mit 60 Kammern
- l) neutrales Mineralöl
- m) Deckgläser
- n) umgekehrtes Phasen-Kontrast-Mikroskop

Da Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen HLA-Antigenen aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit häufig vorkommen, werden zur Testung jedes Antigens mehrere verschiedene Antiseren eingesetzt.

Die HLA-Serensätze zur Routine-Typisierung der Spender von Blutspuren sind der Tabelle 1 A - 1 C zu entnehmen.

TAB. 1A: ANTISERENSATZ ZUR ROUTINETYPISIERUNG
DER HLA-ANTIGENE (MIKROTESTKAMMER I)

1: Anti			1: Anti				
1.a)	Wü 1035	1	A1	6.a)	Barletta Tu 5/79	1	A25+B27
b)	Leschhorn Bad	1	A1	b)	Bio. 2060	1	A25
c)	Schreiber Wi 2/80	2	A1	c)	Res. 7028	1	A25
d)	Fres. Test 7291	1	A1	d)	KN 3076 III	1	A26
e)	Wü 265620	1	A1+B27+w47	e)	Re. 22602	1	A26
f)	Rudolf Wi 11/78	1,5	A1+26	f)	Pres. 2346	1	A26
2.a)	Schwab Bad	1	A2	7.a)	Fres. Test 7089	1	A11
b)	Haydter Wi 2/78	1	A2	b)	KN 6445	1	A11
c)	Auenh. Wi 680572	1	A2	c)	Kiel E 7004	1	A11
d)	Wü 9166956	1	A2	d)	Re. 1103	1	A11
e)	Re. 8103	1	A2+28	e)	Bio. 2020	1	A11
f)	Han 6/76	1	A2+28	f)	Han 15/78	1	A11+1
3.a)	Wolf Tu 41/80	1	A3	8.a)	Kühnböck W1 10/76	1	A28
b)	Wü 153403	1	A3	b)	Mer. 0485	1	A28
c)	Amschl Wi 10/78	1	A3	c)	Wü 519050	1	A28
d)	Gruber Tu	1	A3schw.	d)	Kiel II 104	1	A28
e)	Partes Wi 6/78	1	A9	e)	Fres. 7042	1	A29
f)	Han 94/76	1	A9	f)	Ulm 11041	1	A29
4.a)	Wu 21556	1	A9	9.a)	Rieger Tu 4/79	1	A29
b)	Miksat Tu 7/80	2	Aw23	b)	KN 296002	1	A29
c)	Wü 224613	1	Aw23	c)	Re. 1901	1	A29+w30+w31
d)	Mer. 0612	1	Aw23	d)	Kiel C 4419/2	1	Aw30+w31
e)	Rauer Wi 2/77	1,5	Aw24+23s	e)	KN 4282	2	Aw30+w31
f)	Mer. 0147	2,5	Aw24+1s	f)	PfM	1	Aw30+w31+B13
5.a)	Kain Tu 6/79	1,5	Aw24+Pw22ev.+	10.a)	Machinek Tu 5/72	1	Aw32
b)	Bio. 7029/042	1	Aw24s+Cw2	b)	Bechtele Tu 12/71	1	Aw32+25s
c)	KN 5685	1	A10	c)	Wü 902082	1	Aw32+25
d)	Fres. 70693	2	A10	d)	Re. 86022	1	Aw32+25
e)	Wü 907871	1	A10	e)	Han 9/78	1	Aw32+10
f)	Pulz Tu 2/79	1	A25	f)	Han 7/78	1	Aw32+10

TAB. 1b: ANTISERENSATZ ZUR ROUTINETYPISIERUNG
DER HLA-ANTIGENE (MIKROTESTKAMMER II)

- 13 -

1: Anti		1: Anti			
1. a)	Lohner W1 5/72	1 Aw33+w32+w31+w30+29+11+3	6. a)	Bio. 1020	1 B13
b)	FfM	1 Aw33+w31+w30+29+11+3	b)	Meyer W1 3/74	1 B14
c)	Ostermayer W110/78	1 Aw34+10	c)	Kinzl W1 11/76	1 B14
d)	Fres. Test 70671	1 Aw34+10	d)	Bio 2010	1 B14
e)	Grahm Tü 6/79	3 Aw34+10	e)	Frysak W1 3/77	1 B14+18s
f)	Zand W1 613671	1 Aw34+11+10+1	f)	Reeth W1 9/65	1 B14+18
2. a)	KN 5849	2 Bw51	7. a)	Be. 1502 E	1 B15
b)	Wü 520292	1 B5	b)	Bio. 3050	1 B15
c)	Wü 153570/79	1 B5	c)	Bieher Tü 3/79	2 B15
d)	Forkistl W1 3/77	1 B5+ev. +	d)	Wü 822485	1 B15
e)	Han 3/79	1 B5	e)	Han 27/78	1 B15
f)	Aschbr. W1 10/75	1 B5+w53	f)	Marekow. Tü3/72	6 B15
3. a)	Wü 150316	1 B7	8. a)	Pakdl Tü 2/79	1 B16
b)	Ulm 4890	1 B7	b)	Tamuts. Tü 5/72	2 B16
c)	Han 436/261	1 B7	c)	Han 13/78	1 B16
d)	KN 2773	1 B7	d)	Kiel F 19/75	1 B16
e)	Fres. Test 7088	1 B7	e)	Wü 950 110	1 B16
f)	Huber W1 3/77	1 B8	f)	Pe 8901	1 B16+14+18
4. a)	Lader W1 w5748	1 B8	9. a)	Deutsch W1 3/77	1 Bw38+5s
b)	Öller W1 6/78	1 B8	b)	Ulm 09648	1 Bw38
c)	Wü 516942	1 B8	c)	Frei 2025	1 Bw39
d)	Heigl W1 975094	1 B12	d)	Hbg. 240178	1 Bw39+
e)	Karnik W1 5/71	1 B12	e)	Vetterer Tü4/80	1 B17
f)	Giessen S11370 II	1 B12	f)	Bad 79011	1 B17
5. a)	Giessen 28/73	1 B12	10. a)	Gü 114280 B	1 B17
b)	Vogler Tü 3/80	1 B12	b)	Bio. 3030	1 B17
c)	Wagner-Lö. W1 3/73	1 B13	c)	Be. 1704 D	1 B17
d)	Andretter W1 6/69	1 B13	d)	Pilotto Tü 5/79	3 B18
e)	Hager W1 1/74	1 B13	e)	Hvg. 171177	1 B18
f)	Hlozek W1 558125	1 B13	f)	Be. 1802 A	1 B18

TAB. 1c: ANTISERENSATZ ZUR ROUTINETYPISIERUNG
DER HLA-ANTIGENE (MIKROTESTKAMMER III)

1: Anti

1: Anti

1. a) Pres. 7064 b) Pres. 2687 c) Be. 2105 C d) Bio 20/70 e) Mer 552 f) G6 2601/79	1 B18 1 Bw21 1 Bw21 1 Bw21 1 Bw21 1 Bw21		6. a) Be. 3703 b) Bio c) Villani Tu 3/80 d) Wü 950024 e) Wü 950118 f) Han 14/78	1 B37 1 B37 2 B37 1 B40 1 B40 1 B40	
2. a) Bauer, F. Wi b) Bissinger Tu 5/72 c) Pres. Test 7086 d) Kraber Wi ws279 e) Steinh. Tu 4/72 f) Petery Tu 4/79	1 Bw49 3 Bw49 1 Bw49 1 Bw50 2 Bw50+w49s 1 Bw22		7. a) Pres. Test 7090 b) Pres. Test 2626 c) Kiel B7651 d) Mer. 615 e) Honner Wi555293 f) Edelmann Wü	1 B40 1 B40 1 Bw41+40 1 Bw41+40+ 1 Bw41+40+13+w21s 1 Bw41+40+13+7	
3. a) Hoffmann Tu 6/72 b) Bio 8050 c) Mer. 444 d) Han 21/77 e) Pres. Test 651 f) Pres. Test 653	1 Bw22 1 Bw22 1 Bw22 1 Bw22 1 Bw22 1 Bw22		8. a) Luttinger Pool b) Buckenm. Tu2/79 c) Be. 5202 d) Pres. Test 70623 e) Vatter Tu 1972 f) Blacik Wi 1/78	1,5 Cw2 16 Cw2 1 Cw2 3 Cw2 2 Cw3 1 Cw3	
4. a) Bio 1070 b) Bio 5050 c) G6 1042/80 C d) KN 32/79 e) Moormann W1 2/76 f) Mer. 0302	1 B27 1 B27 1 B27 1 B27 1 B27+7 1 Bw35+Cw4		9. a) Spiegler. Wi b) Furlinger Tu c) Schlösser Tu10/791 d) Be. 5403 e) Be. 5402 f) Tremi ws282 W1	1 Cw3+Bw60+7 1 Cw4 1 Cw4 1 Cw4 1 Cw4 1 Cw4 1 Cw5+E12s	
5. a) Annerl Pool IIW1 b) Hbg. 250/978 c) Buck Tu 3/72 d) Kriegs Tu 6/72 e) Woschn. W1 559196 f) Wü 801437	1 Bw35 1 Bw35+Cw4 1 Bw35 2 Bw35 1 Bw35+5s 1 Bw35+18+5		10. a) Pres. Test 7082 b) Hartmann Tu5/79 c) d) e) neg. Kontrolle f)	1 Cw5 2 Cw7 	

3.3. Durchführung

3.3.1. Lymphozytengewinnung

1) Blutvorbereitung (Defibrinieren):

10 - 20 ml frisch entnommenes Venenblut mit ca. 20 Glasperlen (etwa 4 mm Durchmesser) in einem Erlenmeyer-Kolben 10 - 15 Minuten durch exzentrische Schwenkbewegungen defibrinieren.

2) Isolieren der Lymphozyten:

Einen Teil des Dichtegradienten (Lymphoflot , Ficoll-Isopaque) mit einem Teil defibrinierten Blutes vorsichtig überschichten und 30 Minuten bei 1000 g zentrifugieren.

3) Waschen der Lymphozyten:

Die Lymphozyten, die sich nun als weißer Ring zwischen Plasma und Dichtegradienten befinden, in ein anderes Reagenzglas überführen, mit Hanks-Solution auffüllen und gut durchmischen. 10 Minuten lang bei 160 g waschen. Überstand fast vollständig absaugen, die Lymphozyten gut resuspendieren und erneut Hanks-Solution zugeben. Den Waschvorgang noch zweimal wiederholen.

4) Einstellen der Lymphozytensuspension

durch Zugabe von Hanks-Solution auf eine Zelldichte von ca. 2000 pro Mikroliter (Zählkammer !).

3.3.2. Lymphozytotoxische Reaktion

- 1) Eingeben von je 1 μ l Anti-HLA-Serum bekannter Spezifität in Mikrotestkammern. Zum Schutz gegen Austrocknen der Seren werden die Kammern vorher mit neutralem Paraffinöl aufgefüllt (für die Routinediagnostik bedient man sich meist schon vorgefertigter Testplatten mit den entsprechenden Serensätzen).
- 2) Zugabe von je 1 μ l Lymphozytensuspension. 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren.
- 3) Zugabe von je 5 μ l Kaninchenkomplement (für die vorliegende Untersuchung wurde immer Kaninchenkomplement der gleichen Charge verwendet). 60 Minuten bei 23° C inkubieren.
- 4) Zugabe von je 3 μ l wäßriger, 5%-iger Eosinlösung, filtriert.
- 5) Nach 10 Minuten Zugabe von 8 - 10 μ l 37%-iger, filtrierter Formaldehydlösung, pH 7,2.
- 6) Auflegen eines Deckglases.

Eine Stunde nach Formalinzugabe sind die Lymphozyten sedimentiert und man kann unter dem umgekehrten Phasen-Kontrast-Mikroskop ablesen. Durch die Fixierung mit Formaldehyd ist ein sicheres Ablesen wenigstens noch 3 Tage nach dem Testablauf möglich, wenn die Platten bei 4° C aufbewahrt werden.

3.3.3. Bewertung

Unter dem umgekehrten Phasen-Kontrast-Mikroskop können die Reaktionen in den Mikrotestkammern abgelesen werden. Die zytotoxisch veränderten Lymphozyten erscheinen aufgequollen und dunkel gefärbt; die vitalen Zellen sind etwas kleiner, hell und leuchtend. Für die Bewertung maßgebend ist der Prozentsatz der zytotoxisch veränderten Zellen (Tab. 2).

Tabelle 2: Bewertung des Lymphozytotoxizitätstest

Zytotoxisch veränderte Zellen (%)	Bewertungsstufe
0 - 10	1
11 - 25	2
26 - 50	3
51 - 80	4
81 - 100	5

Eine Reaktion ist dann als positiv zu bewerten, wenn die Bewertungsstufe 4 oder 5 vorliegt. Mit Bewertungsstufe 1 wird das natürliche Absterben von Lymphozyten und damit der Leerwert berücksichtigt. Die Bewertungsstufen 2 und 3 stehen mehr für unspezifische (Kreuz-) Reaktionen, aber auch für unvollständige Reaktionen bei Antisera mit geringer Avidität.

4. ABSORPTIONSTEST

Prinzip des Absorptionstest

Die Blutspur wird mit einem Anti-HLA-Serum bekannter Spezifität inkubiert. Enthält die Spur das dem Antiserum homologe Antigen, so entstehen Antigen-Antikörper-Komplexe, die an die Spur gebunden sind. Nach Entfernen der Spur ist der Titer des verbleibenden Antiserums erniedrigt: Homologe Testlymphozyten werden im NIH-Standard-Test nach Komplementzugabe mit diesem geschwächten Antiserum weit weniger starke Reaktionen zeigen als mit dem gleichen nativen Antiserum.

4.1. Einstellung des Testsystems - Titration der Antiseren

Je 11 Antiseren der Spezifität HLA-A1 und -B7 wurden mit den Testzellen von zwei Personen (HLA-Typ A1, A3, B7, Bw49; A1, A2, B7, B8) mit drei verschiedenen Komplementinkubationszeiten (40, 60, 120 Minuten) im sonst unveränderten NIH-Standard-Test ausstitriert.

Die Verdünnung der Antiseren erfolgte mit Hanks-Solution; jede Verdünnung wurde im dreifachen Ansatz untersucht. Die Ergebnisse dieser Titrations-

reihen sind zum Teil in Tab. 3 angegeben. Dort kann abgelesen werden, bei welcher Verdünnung der Seren 95 % bzw. 50 % Zytolyse der Testzellen auftrat.

Für die Absorptionsuntersuchungen wurden die Testseren so weit verdünnt, daß - bezogen auf Testzellen und Komplementinkubationszeit - zwischen 80 % und 95 % Zytolyse vorlagen. Bereits die nächste Verdünnungsstufe sollte aber schon keine positive Reaktion mehr zeigen. Die Einstellung auf diese Verdünnung sollte gewährleisten, daß die Antikörperabsorption durch die Blutspur im NIH-Standard-Test eine deutliche Titerreduktion ergibt.

Manche Antiseren waren von vornherein so niedrigtitrig, daß sie auch nativ einen Zytolysegrad von 80 % nicht erreichten (Komplementinkubationszeit zum Teil kürzer als beim NIH-Standard-Test !); sie wurden dann unverdünnt verwendet. Die für den Absorptionstest verwendeten Verdünnungen sind in Tab. 4a und 4b angegeben.

Tabelle 3a: Ergebnisse der Titrationsreihen von 11 Anti-HLA-A1-Seren mit den Testzellen Lö: Angegeben sind die Titer, bei denen bei verschiedenen Komplementinkubationszeiten jeweils 95 % bzw. 50 % Zytolyse erfolgten.

ANTI-HLA-A1-SEREN	TESTZELLEN LÖ (HLA-A1,A3,B7,Bw49)					
	KOMPLEMENTINKUBATIONSZEIT					
	40 MIN		60 MIN		120MIN	
	ZYTOLYSE		ZYTOLYSE		ZYTOLYSE	
	95%	50%	95%	50%	95%	50%
	TITER		TITER		TITER	
	1:	1:	1:	1:	1:	1:
VATER II (+ANTI-HLA-A11) N 3286c	1	2	1	2	1	3
	1,5	2,5	1,5	3	1,5	4
MORANO I	1	1,5	1	1,8	1,5	2,5
SCHREIBER 1/77	4	24	6	24	24	48
TÜ SCHEMPF	2	5	3	8	6	12
TÜ KEIL	1	1,5	1,5	2,5	1,5	2,5
TÜ PATTLACH	1,5	2,5	1,5	2,5	2	3,3
A1 L	1	2	1,5	2,5	2	6
Kr 933 II	1	2	1	2,5	1,5	3,3
Kr 6187	1	1,1	1	1,3	1,5	2
FR 147/76 III	1	1,1	1	1,7	1	2,5

Tabelle 3b: Ergebnisse der Titrationsreihen von 11 Anti-HLA-A1-Seren mit den Testzellen Za: Angegeben sind die Titer, bei denen bei verschiedenen Komplementinkubationszeiten jeweils 95 % bzw. 50 % Zytolyse erfolgten.

ANTI-HLA-A1-SEREN	TESTZELLEN ZA (HLA-A1,A2,B7,B8)					
	KOMPLEMENTINKUBATIONSZEIT					
	40 MIN		60 MIN		120 MIN	
	ZYTOLYSE		ZYTOLYSE		ZYTOLYSE	
	95%	50%	95%	50%	95%	50%
	TITER		TITER		TITER	
	1:	1:	1:	1:	1:	1:
VATER II	1	1,5	1	2,5	1	2,5
(+ANTI-HLA-A11)						
N 3286c	1	2	1	2	1	3
MORANO I	1	1,5	1	2	1	2
SCHREIBER 1/77	4	20	4	20	16	32
TÜ SCHEMPF	2	5	2	5	2	6
TÜ KEIL	1	1,2	1	2,5	1	2,5
TÜ PATTLACH	1	2	1	2,5	1	6
A1 L	1	2,5	1,5	4	1	6
KR 933 II	1	1,5	1	2,5	1	3
KR 6187*	1	1,1	1	1,7	1	2,5
	(60%!)					
FR 147/76 III*	1		1	1,5	1	2,5
	(50%!)					

*) Es wurden nur 60 % bzw. 50 % Zytolyse beim nativen Antiserum erreicht.

Tabelle 3c: Ergebnisse der Titrationsreihen von 11 Anti-HLA-B7-Seren mit den Testzellen Lö: Angegeben sind die Titer, bei denen bei verschiedenen Komplementinkubationszeiten jeweils 95 % bzw. 50 % Zytolyse erfolgten.

ANTI-HLA-B7-SEREN	TESTZELLEN Lö (HLA-A1,A3,B7,Bw49)					
	KOMPLEMENTINKUBATIONSZEIT					
	40 MIN		60 MIN		120 MIN	
	ZYTOLYSE		ZYTOLYSE		ZYTOLYSE	
	95%	50%	95%	50%	95%	50%
	TITER		TITER		TITER	
	1:	1:	1:	1:	1:	1:
WÜ BENKERT I,	1	1,1	1	1,7	1	2
WÜ RÜTZEL II	2	5	2	5	3	10
WÜ PITROFF	1	1,5	1	2	1,5	3,3
WÜ SCHABERT II*	1	1,1	1	1,7	1	2,5
(+ANTI-HLA-B27)	(70%!)					
Wi EL FAHIL	1	1,3	1	2	1,5	3,3
ULM 4890	1,5	3,3	2	5	2	6
ULM 4963	3	6	3	10	6	10
ULM 10187	1,5	4	2	5	2	6
(+ANTI-HLA-Bw42)						
FR 6/1906	3	7	3	7	3	7
FR 3152/75	1,5	2,5	1,5	2,5	2	5
(+ANTI-B40/w41)						
WÜ 1503/6	1,5	3,3	2	3,3	1,5	6

*) Es wurden nur 70 % Zytolyse beim nativen Antiserum erreicht.

Tabelle 3d: Ergebnisse der Titrationsreihen von 11 Anti-HLA-B7-Seren mit den Testzellen Za: Angegeben sind die Titer, bei denen bei verschiedenen Komplementinkubationszeiten jeweils 95 % bzw. 50 % Zytolyse erfolgten.

ANTI-HLA-B7-SEREN	TESTZELLEN ZA (HLA-A1,A2,B7,B8)					
	KOMPLEMENTINKUBATIONSZEIT					
	40 MIN		60 MIN		120 MIN	
	ZYTOLYSE		ZYTOLYSE		ZYTOLYSE	
	95%	50%	95%	50%	95%	50%
	TITER		TITER		TITER	
	1:	1:	1:	1:	1:	1:
WÜ BENKERT I*	1		1	1,3	1	2,5
	(40%!)					
WÜ RÜTZEL II	2	5	2	5	2	7
WÜ PITROFF	1	1,2	1	1,7	1	1,7
WÜ SCHABERT II*	1	1,2	1	1,4	1	1,4
(+ANTI-HLA-B27)			(70%!)		(65%!)	
Wi EL FAHIL	1	1,7	1	1,7	1	3
ULM 4890	1	3	1	5	1	5
ULM 4963	3	8	4	10	6	10
ULM 10187	1	2,5	1	3	1	5
(+ANTI-HLA-Bw42)						
FR 6/1906	3	8	3	8	2	8
FR 3152/75	1	1,7	1	3	1	5
(+ANTI-B40/w41)						
WÜ 1503/6	1	3	2	6	1	6

*) Es wurden nur 40 %, 70 % bzw. 65 % Zytolyse beim nativen Antiserum erreicht.

Tabelle 4a: Die für den Absorptionstest verwendeten Anti-HLA-A1-Serumverdünnungen in Abhängigkeit von der Komplementinkubationszeit und den eingesetzten Testzellen Lö (HLA-A1, -A3, -B7, -Bw49); Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8)

	KOMPLEMENT- INKUBATIONS- ZEIT (MIN)	VERDÜNNUNG 1: TESTZELLEN	
		Lö	ZA
<u>ANTI-HLA-A1-SEREN</u>			
VATER II (+ANTI-HLA-A11)	40	1,5	1
	60	1,5	1,5
	120	2	2
N32-6 c	40	2	1,5
	60	2	1,5
	120	3	1,5
MORANO I	40	1	1
	60	1,5	1,5
	120	1,5	1,5
SCHREIBER 1/77	40	12	12
	60	12	12
	120	18	18
TÜ SCHEMPF	40	3	3
	60	3	3
	120	4	4
TÜ KEIL	40	1	1
	60	1,5	1,5
	120	2	1,5
TÜ PATTLÖCH	40	1	1
	60	1,5	1,5
	120	2	1,5
A1 L	40	1	1
	60	2	2
	120	4	2
KR 933 II	40	1	1
	60	1,5	1,5
	120	3	1
KR 6187	40	1	1
	60	1	1,5
	120	1,5	1
FR 147/76 III	40	1	1
	60	1,5	1
	120	1,5	1

Tabelle 4b: Die für den Absorptionstest verwendeten Anti-HLA-B7-Serumverdünnungen in Abhängigkeit von der Komplementinkubationszeit und den eingesetzten Testzellen LÖ (HLA-A1, -A3, -B7, -B8; Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8)

	KOMPLEMENT- INKUBATIONS- ZEIT (MIN)	VERDÜNNUNG 1: TESTZELLEN	
		LÖ	Za
<u>ANTI-HLA-B7-SEREN</u>			
WÜ BENKERT I	40	1	1
	60	1	1
	120	1,5	1,5
WÜ RÜTZEL II	40	4	3
	60	4	4
	120	4	4
WÜ PITROFF	40	1	1
	60	1	1
	120	3	1
WÜ SCHABERT II (+ANTI-HLA-B27)	40	1	1
	60	1	1
	120	1,5	1
W1 EL FAHIL	40	1	1
	60	1	1,5
	120	1,5	2
ULM 4890	40	1,5	2
	60	3	3
	120	2	4
ULM 4963	40	4	4
	60	6	6
	120	8	8
ULM 10187 (+ANTI-HLA-Bw42)	40	2	1,5
	60	3	1,5
	120	4	2
FR 6/1906	40	4	4
	60	5	5
	120	6	6
FR 3152/75 (+ANTI-B40/w41)	40	2	1
	60	2	2
	120	3	1,5
WÜ 1503/6	40	2	1,5
	60	2,5	2,5
	120	3	1,5

4.2. Anlegen von Blutspuren

Sauberer weißer Baumwollstoff wird auf Pappe geheftet und mit 3 - 5 ml noch ungeronnenem Blut getränkt. Die Pappe als Träger für den Baumwollstoff wird zum Aufstellen der nassen Spur geknickt. Der blutgetränkte Stoff wird von der Pappe abgehoben, so daß er, gut belüftet, schneller trocknet. Die trockenen Spuren werden bei 4°C gelagert. Die Untersuchungen erfolgen bei einem Spurenalter von 1 - 4 Wochen, da KUTZ 1982 festgestellt hat, daß sich an Spuren dieses Alters die besten Ergebnisse erzielen lassen.

Eine Aufstellung des HLA-Typs der Spender der Blutspuren findet sich in Tab. 5.

Tabelle 5: HLA-Typus der Spender der verwendeten
Spuren

HLA-

A1	A2	B7	B8
A1	A3	B7	Bw ⁴ 19
A3	A25	B7	B12
A1	Aw23	B8	B12
A1	Aw33	B7	B37
A1	A2	B8	B12
A2	A26	B12	
A2	Aw23	B13	B15
A1	Aw2 ⁴	B8	Bw ⁴ 19
A2	A3	Bw35	
A2	Aw30	B13	B37
A2	Aw30	B5	
A2	A3	B7	B15
A3	A26	B7	Bw22
A3		B7	
A3	A25	B12	B15
A1		B8	B37
A2	A3	B7	B12
A3	A9	B18	Bw35

4.3. Durchführung des Absorptionstests

4.3.1. Absorptionsphase

- 1) Eingeben von je 5 μ l der entsprechend Tabelle 4 verdünnten Antiseren in sogenannte Beckmann-Tubes (0,4 ml Inhalt).
- 2) Überschichten mit 2 Tropfen neutralem Paraffinöl.
- 3) Zugabe von 3 Stanzen Blutspur (Durchmesser 1,5 mm) mit einem Bluttrockengewicht von insgesamt etwa 0,5 mg. Es ist darauf zu achten, daß die Spurenstanzen vollständig in das Antiserum eintauchen!
- 4) Ca. 14 - 16 Stunden bei 4° C inkubieren.

4.3.2. Testphase

- 1) Je 1 μ l des die Spurenstanzen umspülenden Antiserums in vorher beölte Mikrotestkammern einbringen.
- 2) Zugabe von 1 μ l Testlymphozytensuspension, die auf 1000 Zellen pro Mikroliter eingestellt ist. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Im Parallelansatz werden jeweils die Zellen Lö (HLA-A1, -A3, -B7, -Bw49) und Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8) eingesetzt.

- 3) Zugabe von 5 μ l Kaninchenkomplement
und jeweils
 - a) 40 Minuten
 - b) 60 Minuten
 - c) 120 Minutenbei 23° C inkubieren.
- 4) Zugabe von 3 μ l partikelfreier, 5%-iger, wäßri-
ger Eosinlösung.
- 5) Nach 10 Minuten Zugabe von 8 - 10 μ l filtrierter,
37%-iger Formaldehyd-Lösung, pH 7,2.
- 6) Deckglas auflegen.

Bei jeder Untersuchung wurde neben den Blutspuren
auch reines Textilgewebe als "Leerspur" mitgeführt
(Negativkontrolle !). Es wurden 19 Blutspuren unter-
sucht.

4.3.3. Bewertung

Als zytotoxisch geschädigt werden die Zellen bezeichnet, die dunkel und aufgequollen sind oder deren Konturen entrundet und diffus erscheinen. Die Einordnung der Ergebnisse erfolgt nach einer 9-stufigen Skala (Tab. 6), Bewertungsstufe 1. (0 - 10 %) gibt den Leerwert an.

Tabelle 6: Bewertung des Zytotoxizitätstests bei der Untersuchung von Blutspuren

Zytotoxisch veränderte Zellen (%)	Bewertungsstufe
0 - 10	1
11 - 20	2
21 - 30	3
31 - 40	4
41 - 50	5
51 - 60	6
61 - 70	7
71 - 80	8
81 - 90	9
91 - 100	0

5. ERGEBNISSE

- 1) Der Titer eines Antiserums wird erniedrigt, wenn es mit einer Blutspur inkubiert wird, die das homologe Antigen trägt: Es werden Antikörper an der Spur absorbiert.

Eine Reaktion galt als positiv, wenn die Antikörperabsorption durch die Spur mindestens 50% betrug: das heißt, es mußte eine Differenz von mindestens 5 Bewertungsstufen zwischen der Reaktion der Leerspurn mit dem Antiserum und der Reaktion der Blutspur mit dem Antiserum bestehen. Bei 4 oder weniger Bewertungsstufen Unterschied galt die Reaktion als negativ. Erreichte die Leerspurn nicht wenigstens Bewertungsstufe 6, so mußte auf die weitere Beurteilung verzichtet werden. Im Vergleich mit dem HLA-Typus des Spenders der jeweiligen Spur konnten so vier Konstellationen auftreten. Eine Reaktion war entweder richtig positiv (++), richtig negativ (--) oder falsch positiv oder falsch negativ. In Tabelle 7a-d sind die Ergebnisse dargestellt. Dort ist auch angegeben, welche vier Antiseren bei welchen Komplementinkubationszeiten die besten Ergebnisse brachten, die dann der Abbildung 4 zugrundegelegt wurden.

Tabelle 7a: Ergebnisse der Untersuchung zum Nachweis von HLA-A1 in Blutspuren bei Verwendung der Testzellen LÖ (HLA-A1,-A3,-B7,-Bw49) - getrennt nach den Komplementinkubationszeiten von 40, 60, 120 min.

R = Prozentsatz an richtigen Ergebnissen

	KOMPLEMENT- INKUBATIONS- ZEIT (MIN)	TESTZELLEN LÖ(HLA-A1,A3,B7,Bw49) VERDÜNNUNG 1:	REAKTIONSMUSTER				R (%)
			++	FALSCH			
				+	-	--	
<u>ANTI-HLA-A1-SEREN</u>							
VATER II (+ANTI-HLA-A11)	40	1,5	=	=	=	=	
	60	1,5	=	=	=	=	
	120	2	6	8	1	4	53
N 3286c	40	2	=	=	=	=	
	60	2	5	10	2	2	37
	120	3	=	=	=	=	
MORANO I	40	1	0	0	7	12	63
	60	1,5	=	=	=	=	
	120	1,5	0	4	6	8	44
SCHREIBER 1/77	40*	12	2	0	5	12	74
	60	12	0	0	7	12	63
	120	18	0	0	7	12	63
TÜ SCHEMPF	40*	3	2	0	5	12	74
	60	3	0	0	7	12	63
	120	4	1	0	6	12	68
TÜ KEIL	40*	1	5	2	2	10	79
	60	1,5	0	0	7	12	63
	120	2	0	0	7	12	63
TÜ PATTLACH	40	1	=	=	=	=	
	60	1,5	6	5	0	7	72
	120	2	1	1	5	11	67
A1 L	40	1	2	5	5	7	47
	60	2	0	0	7	12	63
	120	4	0	0	7	12	63
KR 933 II	40*	1	1	0	6	12	68
	60	1,5	4	4	2	7	65
	120	3	=	=	=	=	
KR 6187	40	1	0	0	7	12	63
	60	1	6	8	1	4	53
	120	1,5	0	0	7	12	63
FR 147/76 III	40	1	0	0	7	12	63
	60	1,5	=	=	=	=	
	120	1,5	0	0	7	12	63
Σ							41 47 130 252 62,3

Mit * sind die 4 Anti-HLA-A1-Seren bezeichnet, die mit den Testzellen LÖ - abhängig von der Komplementinkubationszeit - die besten Ergebnisse brachten und die der Abb. 4 zugrundegelegt wurden.

Tabelle 7b: Ergebnisse der Untersuchung zum Nachweis von HLA-A1 in Blutspuren bei Verwendung der Testzellen Za (HLA-A1,-A2,-B7,-B8) - getrennt nach den Komplementinkubationszeiten von 40, 60, 120 min.

R = Prozentsatz an richtigen Ergebnissen

	KOMPLEMENT- INKUBATIONS- ZEIT (MIN)	VERDÜNNUNG 1:	TESTZELLEN Za(HLA-A1,A2,B7,B8)				R (%)
			REAKTIONSMUSTER				
			++	FALSCH +	-	--	
<u>ANTI-HLA-A1-SEREN</u>							
VATER II (+ANTI-HLA-A11)	40	1	=	=	=	=	
	60	1,5	=	=	=	=	
	120	2	5	10	1	1	35
N 3286c	40	1,5	=	=	=	=	
	60	1,5	1	0	6	12	68
	120	1,5	1	0	5	11	71
MORANO I	40	1	5	3	2	9	74
	60	1,5	=	=	=	=	
	120	1,5	3	1	3	10	76
SCHREIBER 1/77	40*	12	3	0	4	12	79
	60	12	0	0	7	12	63
	120	18	0	0	6	11	65
TÜ SCHEMPF	40*	3	5	1	2	11	84
	60	3	1	0	6	12	68
	120	4	1	0	5	11	71
TÜ KEIL	40	1	6	3	1	9	79
	60	1,5	=	=	=	=	
	120	1,5	2	0	4	11	76
TÜ PATTLACH	40	1	6	4	1	8	74
	60	1,5	=	=	=	=	
	120	1,5	1	0	5	11	71
A1 L	40	1	2	3	5	9	58
	60	2	0	0	7	12	63
	120	2	0	0	6	11	65
KR 933 II	40	1	6	7	1	5	58
	60	1,5	=	=	=	=	
	120	1	0	0	6	10	63
KR 6187	40	1	=	=	=	=	
	60*	1,5	3	0	4	12	79
	120	1	2	0	4	11	76
FR 147/76 III	40*	1	3	0	4	12	79
	60	1	2	0	5	12	74
	120	1	2	0	4	11	71
Σ			60	32	104	256	69,6

Mit * sind die $\frac{1}{2}$ Anti-HLA-A1-Seren bezeichnet, die mit den Testzellen Za - abhängig von der Komplementinkubationszeit - die besten Ergebnisse brachten und die der Abb. $\frac{1}{2}$ zugrundegelegt wurden.

Tabelle 7c: Ergebnisse der Untersuchung zum Nachweis von HLA-B7 in Blutspuren bei Verwendung der Testzellen L6 (HLA-A1,-A3,-B7,-Bw49) - getrennt nach den Komplementinkubationszeiten von 40, 60, 120 min.

R = Prozentsatz an richtigen Ergebnissen

	KOMPLEMENT- INKUBATIONS- ZEIT (MIN)	VERDÜNNUNG 1:	TESTZELLEN L6(HLA-A1,A3,B7,Bw49) REAKTIONSMUSTER				R (%)
			++	FALSCH +		--	
				-	-		
<u>ANTI-HLA-B7-SEREN</u>							
WU BENKERT I	40	1	7	11	1	0	37
	60	1	8	11	0	0	42
	120	1,5	7	9	1	1	44
WU RÜTZEL II	40	4	6	3	2	8	74
	60*	4	6	1	2	10	84
	120	4	0	0	8	11	58
WU PITROFF	40	1	8	7	0	4	63
	60	1	7	7	1	4	58
	120	3	=	=	=	=	
WU SCHABERT II (+ANTI-HLA-B27)	40	1	2	0	6	11	68
	60	1	7	6	1	5	63
	120	1,5	2	2	4	8	63
Wi EL FAHIL	40	1	7	10	1	1	42
	60	1	8	8	0	3	58
	120	1,5	6	5	2	6	63
ULM 4890	40	1,5	1	0	7	11	63
	60	3	2	0	6	10	67
	120	2	3	0	5	11	74
ULM 4963	40	4	5	0	3	11	84
	60*	6	6	0	2	11	89
	120	8	4	0	4	11	79
ULM 10187 (+ANTI-HLA-Bw42)	40	2	3	1	5	10	68
	60	3	0	0	8	11	58
	120	4	2	0	6	11	68
FR 6/1906	40	4	3	0	5	11	74
	60	5	4	0	4	11	79
	120	6	3	0	5	11	74
FR 3152/75 (+ANTI-B40/w41)	40	2	0	0	8	11	58
	60*	2	5	0	3	10	83
	120	3	0	0	6	10	63
WU 1503/6	40	2	6	0	2	11	89
	60*	2,5	6	0	2	11	89
	120	3	0	0	8	11	58
Σ			134	81	118	266	64,7

Mit * sind die 4 Anti-HLA-B7-Seren bezeichnet, die mit den Testzellen L6 - abhängig von der Komplementinkubationszeit - die besten Ergebnisse brachten und die der Abb. 4 zugrundegelegt wurden.

Tabelle 7d: Ergebnisse der Untersuchung zum Nachweis von HLA-B7 in Blutspuren bei Verwendung der Testzellen Za (HLA-A1,-A2,-B7,-B8) - getrennt nach den Komplementinkubationszeiten von 10, 60, 120 min.

R = Prozentsatz an richtigen Ergebnissen

	KOMPLEMENT- INKUBATIONS- ZEIT (MIN)	VERDÜNNUNG 1:	TESTZELLEN Za(HLA-A1.A2.B7.B8)					R (%)
			REAKTIONSMUSTER					
			++	FALSCH +	-	--		
<u>ANTI-HLA-37-SEREN</u>								
WU BENKERT I	40	1	7	10	1	1	42	
	60	1	6	6	2	5	53	
	120	1.5	7	3	1	6	76	
WU RÜTZEL II	40	3	5	1	3	10	79	
	60	4	7	2	1	9	84	
	120	4	1	0	6	11	71	
WU PITROFF	40	1	7	10	1	1	42	
	60*	1	7	1	1	10	89	
	120	1	4	0	4	8	75	
WU SCHABERT II (+ANTI-HLA-B27)	40	1	6	1	2	10	34	
	60	1	3	0	5	11	74	
	120	1	4	0	4	9	76	
W1 EL FAHIL	40	1	8	10	0	1	47	
	50	1.5	=	=	=	=		
	120	2	5	2	3	7	71	
ULM 4890	40	2	5	5	3	6	58	
	60	3	1	0	7	11	63	
	120	4	3	0	5	9	71	
ULM 4963	40	4	5	0	3	11	84	
	60*	6	6	0	2	11	39	
	120	8	2	0	6	9	65	
ULM 10187 (+ANTI-HLA-Bw42)	40*	1.5	5	0	3	11	84	
	60	1.5	2	0	6	11	63	
	120	2	0	0	8	9	53	
FR 6/1906	40	4	2	0	6	11	68	
	60	5	0	0	8	11	58	
	120	6	0	0	8	9	53	
FR 3152/75 (+ANTI-940/w41)	40	1	5	2	2	9	78	
	60*	2	6	0	2	11	89	
	120	1.5	=	=	=	=		
WU 1503/6	40	1.5	5	1	3	10	79	
	60	2.5	1	0	7	11	63	
	120	1.5	0	0	8	9	53	
Σ			125	54	121	268	69.2	

Mit * sind die ¹/₁ Anti-HLA-B7-Seren bezeichnet, die mit den Testzellen Za - abhängig von der Komplementinkubationszeit - die besten Ergebnisse brachten und die der Abb. ¹/₄ zugrundegelegt wurden.

- 2) Da bei den Untersuchungen mehrere Anti-HLA-Seren eingesetzt wurden, kann man den Grad der Antikörperabsorption nach folgender Gleichung berechnen:

$$\frac{S_L - S_{SP}}{S_L - n} \times 100 = \text{Antikörperabsorption (\%)}$$

S_L = Summe der Bewertungsstufen der Antiseren
der gleichen Spezifität in der Leerspur

S_{SP} = Summe der Bewertungsstufen der Antiseren
der gleichen Spezifität in einer Blutspur

n = Anzahl der Antiseren

In den Abbildungen 2 und 3 sind für die Untersuchung der 19 Spuren mit je 11 Antiseren pro Antigen die Ergebnisse, getrennt nach Testzellen und Komplementinkubationszeiten, dargestellt.

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse angegeben, die erzielt wurden, wenn - getrennt nach Testzellen - die Reaktion der jeweils 4 "besten Seren (Tab. 7a-d) zugrundegelegt wurde. Dabei waren verschiedene Komplementinkubationszeiten möglich.

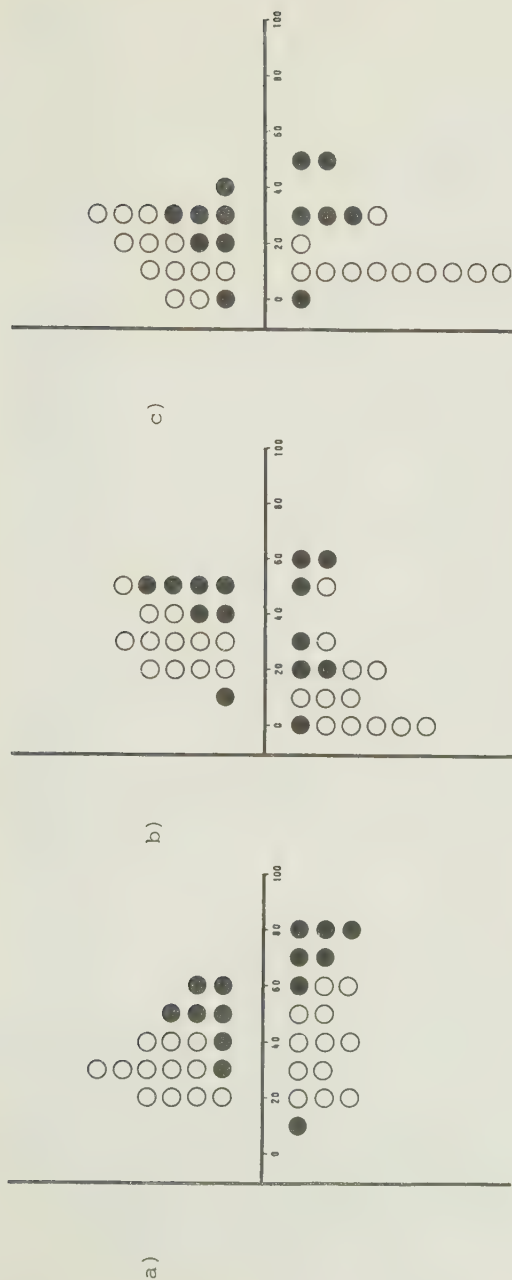


Abb. 2 Antikörperabsorption von HLA-A1-positiven (●) und HLA-A1-negativen (○) Spuren. Es wurden die in Tab. 7a bzw. 7b angegebenen Testseren verwendet. Die Komplementinkubationszeiten betragen a) 40, b) 60 und c) 120 min. Die im jeweils oberen Teil der Abb. a), b) und c) dargestellten Ergebnisse wurden mit den Testzellen L6 (HLA-A1, -A3, -B7, -Bw49), die im jeweils unteren Teil dargestellten Ergebnisse mit den Testzellen Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8) gewonnen.

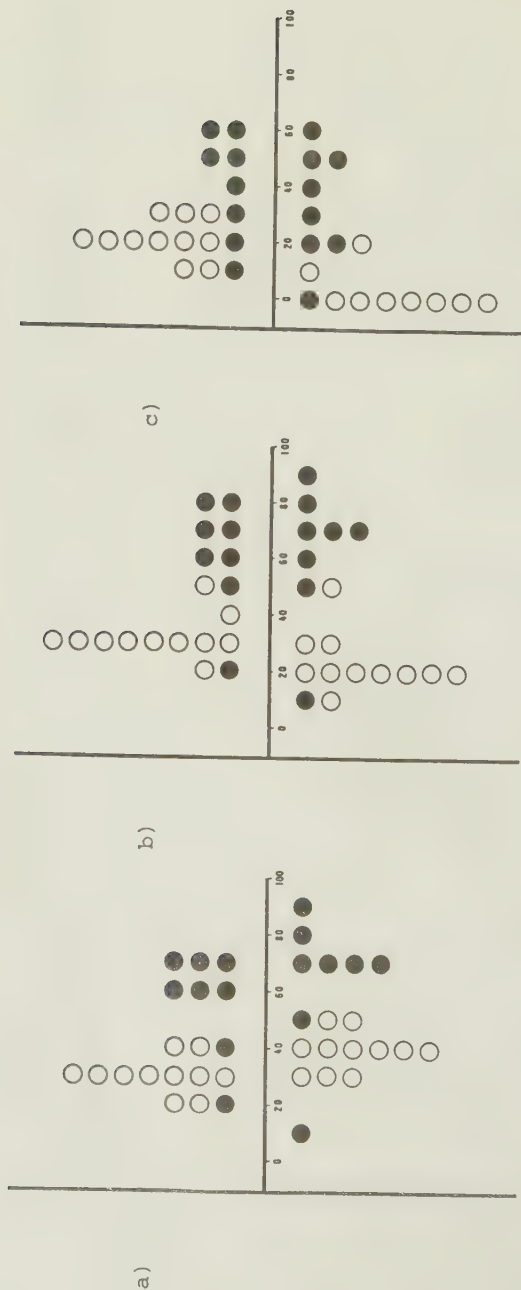


Abb. 3 Antikörperabsorption von HLA-B7-positiven (●) und HLA-B7-negativen (O) Spuren. Es wurden die in Tab. 7c bzw. 7d angegebenen Testseren verwendet. Die Komplementinkubationszeiten betragen a) 40, b) 60 und c) 120 min. Die im jeweils oberen Teil der Abb. a), b) und c) dargestellten Ergebnisse wurden mit den Testzellen Lö (HLA-A1, -A3, -B7, -Bw49), die im jeweils unteren Teil dargestellten Ergebnisse mit den Testzellen Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8) gewonnen.

6. DISKUSSION

Die Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von DÖRR und KUTZ (1982) darin, daß der Absorptionstest grundsätzlich ein gangbarer Weg ist, HLA-Antigene in Spuren zu bestimmen.

Insgesamt zeigten sich die Testzellen Za geeigneter für die Untersuchung der Antigene HLA-A1 und -B7. Bei den Zellen Za betrug die durchschnittliche Richtigkeit der Ergebnisse für HLA-A1 69,6 %, für HLA-B7 69,2 %. Bei den Zellen Lö betrug die durchschnittliche Richtigkeit der Ergebnisse für HLA-A1 62,3 %, für HLA-B7 64,7 %.

60 Minuten Komplementinkubationszeit erwiesen sich insgesamt als am besten in bezug auf die Anzahl der richtigen Reaktionen - sie betrugen bei 40 Minuten 70 % (Za), 65,8 % (Lö); bei 60 Minuten 71,9 % (Za), 65,7 % (Lö) und bei 120 Minuten 66,9 % (Za), 62,7 % (Lö) - , wobei es durchaus serumspezifische Unterschiede gab.

Die meisten falsch positiven Ergebnisse zeigten die Untersuchungen bei 40 Minuten Komplementinkubation (16,9 % (Za), 10,8 % (Lö); bei 60 Minuten 2,5 % (Za), 16,9 % (Lö), bei 120 Minuten 4,3 % (Za), 8,2 % (Lö)).

Als Maß für das Diskriminationsvermögen der vorgestellten Methode kann die Mediandifferenz zwischen den Er-

gebnissen der antigenpositiven und antigennegativen Spuren herangezogen werden. Die Mediandifferenzen der Antikörperabsorption sind allerdings relativ gering, können aber durch die Auswahl der vier besten Antiseren pro Antigen vergrößert werden, wenn verschiedene Komplementinkubationszeiten eingesetzt werden (Tab. 8). Jedoch verhindert auch diese Selektion nicht die Überschneidung der Antikörperabsorption von Spuren, die das Antigen tragen, und anderen, die das Antigen nicht besitzen.

Die Einführung verschiedener Komplementinkubationszeiten für eine Spurenuntersuchung erscheint auch zu aufwendig für die Routine.

Tabelle 8: Differenzen der Medianwerte der Antikörperabsorption der Spuren, die das Antigen HLA-A1 bzw. -B7 aufweisen, und der Spuren, die diese Antigene jeweils nicht aufweisen. Die Werte sind getrennt nach den Testzellen Lö (HLA-A1,-A3,-B7,-Bw49) und Za (HLA-A1,-A2,-B7,-B8) angegeben. In Spalte A sind jeweils die Werte unter Einbeziehung aller Antiseren entsprechender Spezifität, getrennt nach den Komplementinkubationszeiten von 40, 60 und 120 min, angegeben. Spalte B berücksichtigt nur die 4 "besten" Antiseren bei der für sie günstigsten Komplementinkubationszeit.

KOMPLEMENT- INKUBATIONS- ZEIT	HLA-A1				HLA-B7			
	Lö		Za		Lö		Za	
	A ALLE SEREN	B "BESTE" SEREN	A ALLE SEREN	B "BESTE" SEREN	A ALLE SEREN	B "BESTE" SEREN	A ALLE SEREN	B "BESTE" SEREN
40 MIN	22%	41%	34%	50%	31%	61%	36%	51%
60 MIN	15%		31%		38%		48%	
120 MIN	10%		21%		22%		35%	

7. UNTERSUCHUNG ZUR EIGNUNG VON (HAPLOTYPGLEICHEN !)
VERWANDTENLYMPHOZYTEN IM ABSORPTIONSTEST AN SPUREN

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich der Absorptionstest verbessern ließe, wenn mit Testlymphozyten untersucht würde, die den Zellen des Spurenverursachers in ihrem Reaktionsverhalten weitgehend ähneln. Die Zellen des Spurenverursachers erfüllen diese Bedingung natürlich in idealer Weise. Aber auch Zellen von Verwandten des Spurenverursachers kommen für diese Untersuchung in Frage, wenn sie wenigstens einen Haplotyp mit ihm gemeinsam haben.

Es wurden Blutspuren von Mitgliedern von drei Familien angelegt, die auf das Vorhandensein der Antigene HLA-A1, -A2, -B7 und -B8 untersucht werden sollten. Die drei Stammbäume und der HLA-Typ der Familienmitglieder sind in Tabelle 9 angegeben.

Je Antigen wurden 5 Antiseren verwendet, die sich in früheren Untersuchungen (KUTZ 1982) bewährt hatten. (Tab. 10). Alle Spuren wurden mit den Zellen Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8) untersucht, die bei den Versuchen unter 4. bessere Ergebnisse beim Nachweis der Antigene HLA-A1 und -B7 erbracht hatten als die Zellen Lö (HLA-A1, -A3, -B7, -Bw 49) und mit ihnen überdies die beiden häufigen Antigene HLA-A2 und -B8 nachweisbar sind. Zusätzlich wurde, wo möglich, die Blut-

spur des einen Familienangehörigen mit den Zellen des anderen getestet. Sowohl die Zellen Za als auch die anderen in Frage kommenden Zellen wurden mit den Antiseren austitriert (Tab. 11). Die im Absorptionstest eingesetzten Serumtiter sind - abhängig von den Testzellen - der Tabelle 11 zu entnehmen.

Die in den Voruntersuchungen als am besten geeignete Komplementinkubationszeit von 60 Minuten wurde für diese Untersuchung eingesetzt. Die Einstellung des Testsystems und das Anlegen von Spuren sowie der gesamte Testvorgang und die Bewertung wurden, wie unter 4. beschrieben, durchgeführt.

12 Spuren von Spendern aus drei Familien wurden untersucht; das Spurenalter lag zwischen 9 und 21 Tagen.

Tabelle 9: Stammbäume der Familien Kr, Wg und Lö mit Angabe der HLA-Genotypen der Familienmitglieder. Die Personen wurden mit den Buchstaben A - M markiert.

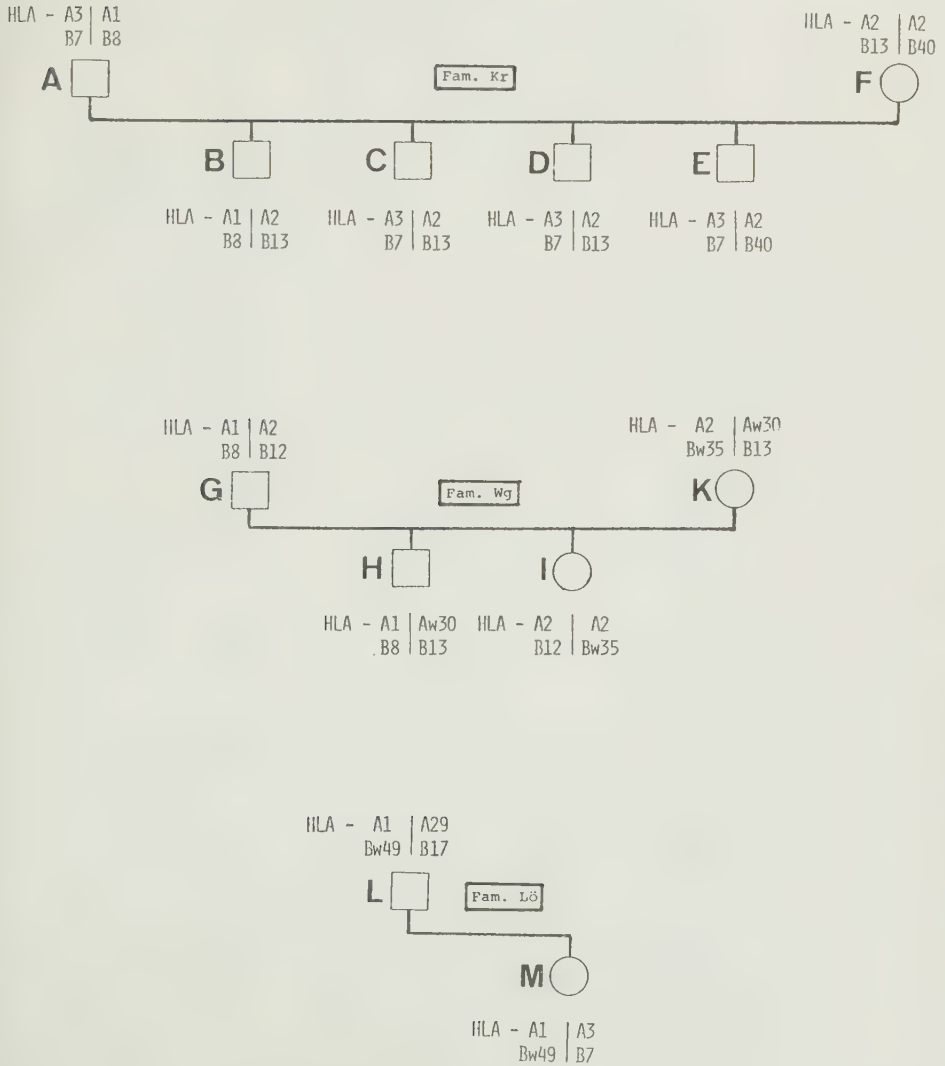


Tabelle 10: Ergebnisse der Titrationsreihen von je 5 Anti-HLA-A1,-A2,-B7 und -B8-Seren mit den Testzellen Za (HLA-A1,-A2,-B7,-B8) und - wo möglich - mit den Zellen A, C, H, K und M (siehe Tab. 9 !). Angegeben sind die Titer, bei denen bei 60 min. Komplementinkubationszeit jeweils 95 % bzw. 50 % Zytolyse erfolgten.

	ZELLEN A		ZELLEN C		ZELLEN K		ZELLEN H		ZELLEN M		ZELLEN 7A	
	ZYTOLYSE 95%	50%	ZYTOLYSE 95%	50%	ZYTOLYSE 95%	50%	ZYTOLYSE 95%	50%	ZYTOLYSE 95%	50%	ZYTOLYSE 95%	50%
	TITER		TITER		TITER		TITER		TITER		TITER	
	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:
ANTI-HLA-A1-SEREN:												
BAD KREUZNACH 933 II	1	4					1	1,7	1	2,5	1	2,5
SEDERL	1	2					1	1,5	1	1,7	1	1,5
BAD KREUZNACH 6187	1	2					1	1,5	1	1,5	1	1,5
TÜ SCHEMPF	2,5	6					2	4	2	4	2	4
SCHREIBER 1/77	6	12					6	12	3	12	3	9
ANTI-HLA-A2-SEREN:												
WU 112965			2	3,3	1	3					1	2
WU 506780			6	12	6	9					4,5	9
AUERHAMMER			1,5	3	1,5	3					1	2,5
WU 916956			2,3	3,3	3	6					1,5	4,5
BAD KREUZNACH 3780			1,5	3	1,5	3,3					1	2,5
ANTI-HLA-B7-SEREN:												
ULM 4963	6	12	4,5	9					4,5	9	4,5	9
WU 150316	1,5	4,5	2,3	4,5					1,5	4,5	1,5	4
FR 6/1906	3	6	3	6					3	6	2	6
WU RÜTZEL	3	6	2	5					3	6	3	5
ULM 4890	2,3	4,5	2,3	4,5					2,3	4,5	1,5	4
ANTI-HLA-B8-SEREN:												
ULM 2240	1	1,7			1	1,5					1	1,5
HUBER 3/77	1	3			1	2,5					1	3
GELBMANN 3/69	2	6			2	4					2	5
WU 516942	1	3			1	2					1	2
ULM 40198	3	6			2,3	4,5					2,3	5

Tabelle 11: Die für den Absorptionstest verwendeten Serumverdünnungen in Abhängigkeit von den verschiedenen Testzellen Za (HLA-A1,-A2,-B7,-B8), A, C, H, K und M (HLA-Typ siehe Tab. 9).

	ZELLEN A	ZELLEN C	ZELLEN K	ZELLEN H	ZELLEN M	ZELLEN 7A
	TITER 1:	TITER 1:	TITER 1:	TITER 1:	TITER 1:	TITER 1:
ANTI-HLA-A1-SEREN:						
BAD KREUZNACH 933 II	1,5			1	1	1
SEDERL	1			1	1	1
BAD KREUZNACH 6187	1			1	1	1
TÜ SCHEMPF	2,5			2	2	2
SCHREIBER 1/77	6			6	4,5	3
ANTI-HLA-A2-SEREN:						
WU 112965		2	1,5			1
WU 506780		6	6			4,5
AUERHAMMER		1,5	1,5			1
WU 916956		2,3	3			2,3
BAD KREUZNACH 3780		1,5	1,5			1
ANTI HLA-B7-SEREN:						
ULM 4963	6	6			6	4,5
WU 150316	2,3	2,3			2,3	1,5
FR 6/1906	3	4			3	3
WU RÜTZEL	3	3			3	3
ULM 4890	2,3	2,3			3	1,5
ANTI-HLA-B8-SEREN:						
ULM 2240	1			1		1
HUBER 3/77	1			1		1
GELBMANN 3/69	3			2		2
WU 516942	1			1		1
ULM 40198	3			2,3		2,3

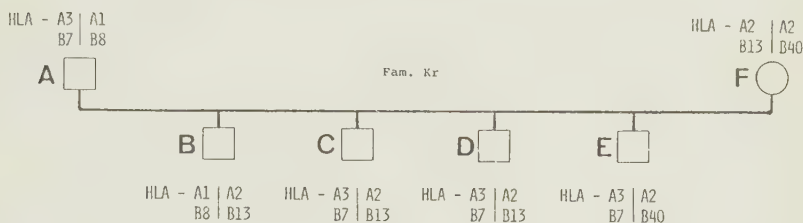
8. ERGEBNISSE

In Tabelle 12a-c sind die Testergebnisse der Untersuchungen mit den "Verwandtenlymphozyten" angegeben. Die errechnete Antikörperabsorption der Spuren bei Verwendung der Testzellen Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8) wurde mit dem entsprechenden Wert bei Verwendung von "Verwandtenlymphozyten" verglichen (Tab. 13a-c).

9. DISKUSSION

Die Tabellen 12a-c und 13a-c zeigen, daß bei Verwendung der Zellen Za fast immer richtigere Ergebnisse resultierten als bei Verwendung von Verwandtenlymphozyten. Offenbar ist die Eignung von Zellen im Testsystem isoliert zu betrachten und nicht in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Spur zu sehen.

Tabelle 12a: Ergebnisse der Untersuchung von 6 Blutspuren A - F bei Verwendung der Testzellen Za (HLA-A1,-A2,-B7,-B8), A und C. Komplementinkubationszeit: 60 min.



Testzellen

	SPUR A			SPUR B			SPUR C			SPUR D			SPUR E			SPUR F	
ANTI-HLA-A1-SEREN:	Za	A	C	Za	A	C	Za	A	C	Za	A	C	Za	A	C	Za	C
BAD KREUZNACH 933 II	4	8		3	5		7			3			7			9	
SEDERL	4	7		3	4		4			5			3			4	
BAD KREUZNACH 6187	4	6		2	6		4			1			3			5	
TÜ SCHEMPF	6	9		9	6		0			9			8			0	
SCHREIBER 1/77	0	0		0	9		0			0			0			0	
ANTI-HLA-A2-SEREN:																	
WU 112965	7			7		8	8	7	7	5	8					5	8
WU 506780	7			2	0	9	9	9	9	8	0					2	0
AUERHAMMER	8			6	9	5	0	4	0	3						8	0
WU 916956	7			5	8	9	9	7	9	6						7	9
BAD KREUZNACH 3780	3			3		x	x	x	2	x	1					x	7
ANTI-HLA-B7-SEREN:																	
ULM 4963	3	0	9	9			8	0	9	7	8	9	7	0	0	5	
WU 150316	6	0	9	9			9	0	9	5	6	0	8	0	0	6	
FR 6/1906	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
WU RÜTZEL	9	0	8	0			0	9	8	0	0	0	9	0	0	0	
ULM 4890	0	0	0	0			0	0	0	0	0	8	0	0	7	0	
ANTI-HLA-B8-SEREN:																	
ULM 2240	3	7		2	7		4			5			5			5	
HUBER 3/77	7	8		6	5		4			5			3			0	
GELBMANN 3/69	6	9		9	9		0			0			0			0	
WU 516942	8	9		7	8		6			9			8			0	
ULM 40198	6	9		8	8		0			8			9			9	

Zytolysegrad von 0 - 9 entsprechend Tabelle 6.

Tabelle 12b: Ergebnisse der Untersuchung von 4 Blutspuren G - K bei Verwendung der Testzellen Za (HLA-A1,-A2,-B7,-B8), H und K. Komplementinkubationszeit: 60 min.

		HLA - A1 A2 B8 B12				HLA - A2 A2 Bw35 B13	
G		Fam. Wg				K	
		H		I			
		HLA - A1 A2 B8 B13		HLA - A2 A2 B12 Bw35			
Testzellen		SPUR G		SPUR H		SPUR I	
		Za	H	Za	H	Za	K
ANTI-HLA-A1-SEREN:							
BAD KREUZNACH 933 II		5	8	4	7	2	6
SEDERL		4	2	2	3	4	5
BAD KREUZNACH 6187		2	2	2	5	3	2
TÜ SCHEMPF		7	8	7	7	7	6
SCHREIBER 1/77		0	0	0	9	0	0
ANTI-HLA-A2-SEREN:							
WU 112965		6		7		1	1
WU 506780		2		0		4	1
AUERHAMMER		3		5		2	1
WU 916956		6		7		2	1
BAD KREUZNACH 3780		2		3		1	2
ANTI-HLA-B7-SEREN:							
ULM 4963		0		0		8	
WU 150316		6		9		5	
FR 6/1906		0		0		9	
WU RUTZEL		9		9		7	
ULM 4890		7		9		0	
ANTI-HLA-B8-SEREN:							
ULM 2240		4	5	2	3	2	3
HUBER 3/77		5	6	5	5	3	4
GELBMANN 3/69		9	8	3	9	6	7
WU 516942		6	7	1	7	5	5
ULM 40198		3	4	7	0	6	6

Zytolysegrad von 0 - 9 entsprechend Tabelle 6.

Tabelle 12c: Ergebnisse der Untersuchung von 2 Blutspuren
L und M bei Verwendung der Testzellen Za(HLA-
A1-,A2,-B7,-B8), L und M. Komplementinkuba-
tionszeit: 60 min.

HLA - A1 A29 Bw49 B17 L Fam. L8 M					
HLA - A1 A3 Bw49 B7					
Testzellen	SPUR L		SPUR M		
	Za	M	Za	M	
ANTI-HLA-A1-SEREN:					
BAD KREUZNACH 933 II	2	7	6	8	
SEDERL	4	5	4	5	
BAD KREUZNACH 6187	2	3	2	4	
TU SCHEMPF	8	0	6	0	
SCHREIBER 1/77	0	0	0	0	
ANTI-HLA-A2-SEREN:					
WU 112965	7		9		
WU 506780	7		0		
AUERHAMMER	5		6		
WU 916956	8		8		
BAD KREUZNACH 3780	2		3		
ANTI-HLA-B7-SEREN:					
ULM 4963	6		4	6	
WU 150316	8		6	6	
FR 6/1906	0		0	0	
WU RUTZEL	0		9	8	
ULM 4890	0		8	9	
ANTI-HLA-B8-SEREN:					
ULM 2240	4		3		
HUBER 3/77	4		4		
GELBMANN 3/69	0		0		
WU 516942	5		5		
ULM 40198	0		7		

Zytolysegrad von 0 - 9 entsprechend Tabelle 6.

Tabelle 13a: Antikörperabsorption (%) der Spuren A - F bei Verwendung der Testzellen Za (HLA-A1,-A2,-B7,-B8), A und C.

HLA - A3 | A1

B7 | B8

HLA - A2 | A2

B13 | B40

A

Fom. Kr

F

B

C

D

E

HLA - A1 | A2

B8 | B13

HLA - A3 | A2

B7 | B13

HLA - A3 | A2

B7 | B13

HLA - A3 | A2

B7 | B40

Testzellen

SPUR A

SPUR B

SPUR C

SPUR D

SPUR E

SPUR F

Za

A

C

Za

A

C

Za

A

C

Za

A

C

Za

A

C

Za

C

ANTI-HLA-A1-SEREN

47

19

49

42

30

47

40

23

ANTI-HLA-A2-SEREN

39

57

11

23

11

45

20

48

50

11

ANTI-HLA-B7-SEREN

23

0

2

0

2

0

2

14

9

2

9

0

2

16

ANTI-HLA-B8-SEREN

40

12

36

24

31

24

29

7

Tabelle 13b: Antikörperabsorption (%) der Spuren G - K bei Verwendung der Testzellen Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8), H und K.

HLA - A1 | A2
B8 | B12

G

Fam. Wg

HLA - A2 | Aw30
Bw35 | B13

K

H

I

HLA - A1 | Aw30
B8 | B13

HLA - A2 | A2
B12 | Bw35

Testzellen

	SPUR G		SPUR H		SPUR I		SPUR K	
	Za	H	Za	H	Za	K	Za	K
ANTI-HLA-A1-SEREN	47	42	53	40	51		44	
ANTI-HLA-A2-SEREN	68		39		89	98	77	77
ANTI-HLA-B7-SEREN	14		5		21		21	
ANTI-HLA-B8-SEREN	48	40	69	26	60		52	

Tabelle 13c: Antikörperabsorption (%) der Spuren L und M bei Verwendung der Testzellen Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8), L. und M.

HLA - A1 | A29
Dw49 | B17

L

Fam. Ld

M

HLA - A1 | A3
Bw49 | B7

Testzellen

	SPUR L		SPUR M	
	Za	M	Za	M
ANTI-HLA-A1-SEREN	51	30	47	26
ANTI-HLA-A2-SEREN	45		30	
ANTI-HLA-B7-SEREN	9		26	21
ANTI-HLA-B8-SEREN	33		43	

10. UNTERSUCHUNG ZUR REPRODUZIERBARKEIT VON ERGEBNISSEN
AUS DEM ABSORPTIONSTEST AN SPUREN

Die Ergebnisse aus den vorstehenden Untersuchungen ließen es notwendig erscheinen, die Reproduzierbarkeit der Resultate bei zweifacher Untersuchung derselben Spur am gleichen Tag und an verschiedenen Tagen zu überprüfen: Hierfür wurden Blutspuren auf die 4 HLA-Antigene HLA-A1, -A2, -B7, -B8 untersucht. Die Testseren waren identisch mit denen der vorhergehenden Untersuchung. Die Untersuchungen wurden wieder mit den Testzellen Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8) vorgenommen.

Die Komplementinkubationszeit von 60 Minuten wurde für diese Bestimmung beibehalten. Die Einstellung des Testsystems und das Anlegen von Blutspuren sowie der gesamte Testvorgang und die Bewertung erfolgten wieder nach der unter 4. angegebenen Vorschrift. Tab. 14 zeigt die Titrationsergebnisse bei 95 % und 50 % Zytolyse.

Untersucht wurden 11 Spuren (Tab. 15): Eine erste Doppeluntersuchung erfolgte bei einem Spurenalter von 5 - 15 Tagen, eine zweite (Kontroll-) Untersuchung erfolgte 18 - 25 Tage nach Anlegen der Spuren.

Tabelle 14: Ergebnisse der Titrationsreihen von je 5 Anti-HLA-A1,-A2,-B7,-B8-Seren mit den Testzellen Za(HLA-A1,-A2,-B7,-B8) bei einer Komplementinkubationszeit von 60 min. Angegeben sind die Titer, bei denen jeweils 95 % bzw 50 % Zytolyse erfolgten.

	ZYTOLYSE	
	95%	50%
	TITER	
	1:	1:
ANTI-HLA-A1-SEREN:		
BAD KREUZNACH 933 II	1	3
SEDERL	1	1,5
BAD KREUZNACH 6187	2,5	3,3
TÜ SCHEMPF	2	3,3
SCHREIBER 1/77	6	8
ANTI-HLA-A2-SEREN:		
WÜ 112965	1,5	3,3
WÜ 506780	3	3,3
AUERHAMMER	1,5	3,3
WÜ 916956	3	4
BAD KREUZNACH 3780	1,5	2,5
ANTI-HLA-B7-SEREN:		
ULM 4963	3	4
WÜ 150316	3	3,3
FR 6/1906	3	6
WÜ RÜTZEL	3	6
ULM 4890	2,5	3,3
ANTI-HLA-B8-SEREN:		
ULM 2240	1,5	2,5
HUBER 3/77	1	2,5
GELBMANN 3/69	1,5	3,3
WÜ 516942	2	3,3
ULM 40198	3	4

11. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse galten als gut reproduzierbar, wenn weniger als 3 Bewertungsstufen Unterschied zwischen den beiden Bewertungen im Doppelansatz oder zwischen dem Mittelwert der beiden Bewertungen im Doppelansatz und der Bewertung der Kontrolluntersuchung an einem anderen Tag bestand. War diese Differenz 3 oder mehr Bewertungsstufen, dann galten die Ergebnisse als nicht reproduziert. In Tab. 15 sind alle Werte angegeben und die "nicht reproduzierten" gekennzeichnet.

12. DISKUSSION

Bei 220 Untersuchungen (11 Spuren mit je 20 Antiseren getestet) gab es 12 Ergebnisse (~5 %), die mehr als 2 Bewertungsstufen auseinanderlagen, obwohl sie am gleichen Tag unter gleichen Bedingungen parallel erzielt wurden. In 29 Fällen (~13 %) betrug die Differenz der Mittelwerte der Doppelbestimmung und des Wertes der Kontrolluntersuchung an einem anderen Tag 3 oder mehr Bewertungsstufen.

Es fiel auf, daß bei manchen Spuren sehr häufig die Ergebnisse bei der dritten (Kontroll-) Untersuchung schlecht reproduzierbar waren, andere Spuren von dieser Änderung aber kaum oder gar nicht betroffen wurden. Die Abweichung zu den Ergebnissen der Doppeluntersuchungen war merkwürdigerweise immer gleichsinnig; entweder waren die Ergebnisse bei einer Spur in Bezug auf die Doppeluntersuchungen immer stärker erhöht oder immer stärker erniedrigt - ohne Rücksicht darauf, ob die Werte dadurch falsch oder richtig positiv oder negativ wurden. Die beschriebene gerichtete Änderung errechnet sich explorativ im Rahmen einer Varianzanalyse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ als hoch signifikant. Das weist darauf hin, daß sich eine Untersuchung von Spuren auf HLA-Antigene mit der Absorptionsmethode verbieten könnte, da die Ergebnisse zwar gerichtet,

aber unerklärlich abhängig vom Spurenalter und der Spur selbst schwanken und man diese Schwankung nicht vorhersehen oder nachvollziehen kann. Diese Untersuchung ist allerdings nicht so umfangreich, daß eine definitive statistische Bewertung möglich wäre.

Es errechnete sich als statistisch signifikant ($p < 0,05$), daß die eben beschriebenen Änderungen bei bestimmten Antiseren gehäuft auftreten, bei anderen dagegen kaum oder gar nicht. Dies ist aber kein prinzipielles Hindernis für die Durchführung des Absorptionstests zur Spurenuntersuchung, da man die entsprechenden Seren rechtzeitig als unzuverlässig erkennen und ersetzen kann.

Die Änderung der Bewertungen beim Parallelansatz am gleichen Tag ist weniger ausgeprägt und ungerichtet. Retrospektiv läßt sich erkennen, daß trotz Titration der Testseren mit den Testzellen Za (HLA-A1, -A2, -B7, -B8) die Titer der Seren häufig zu hoch waren; dieses war insbesondere bei den Anti-HLA-B7-Seren der Fall.

13. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung des HLA-Systems an Blutspuren zu ihrer Individualisierung würde für die forensische Spurenkunde eine große Bereicherung darstellen. Die von verschiedenen Autoren in den letzten Jahren zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen wurden in der vorliegenden Untersuchung nachgearbeitet und systematisch modifiziert. In die Untersuchungen wurden die Antigene HLA-A1, -A2, -B7 und -B8 einbezogen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der von NEWALL und HODGE (1979) angegebene und von DÖRR und KUTZ (1982) modifizierte Absorptionstest bezüglich dreier Parameter (Komplementinkubationszeit, Testzellen, Anti-HLA-Seren) variiert. Hier wurden nur die Antigene HLA-A1 und -B7 untersucht. Zu 5 µl auf die Testzellen austitriertem Antiserum wurde eine Blutspur mit ca. 0,5 mg Spur-Trockengewicht gegeben und nach Über-Nacht-Inkubation bei + 4° C mit dem NIH-Standardtest geprüft, ob eine Absorption stattgefunden hätte. Das Testsystem wurde folgendermaßen variiert:

- 1) 3 verschiedene Komplementinkubationszeiten (40, 60, 120 min - dazu waren die Testzellen entsprechend austitriert worden) wurden beim NIH-Standard-Test eingesetzt.

- 2) Testzellen von zwei verschiedenen Spendern wurden einbezogen.
- 3) Für jedes Antigen wurden 11 verschiedene HLA-Antisera verwendet.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, daß eine Komplementinkubationszeit von 60 Minuten die besten Ergebnisse brachte und daß die verschiedenen Testzellen und Testseren große Unterschiede bezüglich ihrer Eignung für den Test zeigten. Im Durchschnitt ergab sich eine Richtigkeit der Ergebnisse von 66 %. Nach Optimierung der Untersuchungsbedingungen waren das Antigen HLA-A1 in 70 % der Fälle und das Antigen HLA-B7 in 88 % der Fälle richtig nachweisbar.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob mit den Testzellen blutsverwandter Personen 1. Grades, die einen oder beide Haplotypen mit dem Spurenverursacher gemeinsam haben, die Richtigkeit der Ergebnisse verbessert werden könnte. Dazu wurde die Untersuchung der Antigene HLA-A1, -A2, -B7, -B8 an Blutspuren von Mitgliedern aus 3 Familien vorgenommen. Die Testseren waren dafür auf die Testzellen der Blutsverwandten ausgetitriert worden; Testzellen einer nichtverwandten Person (Referenztestzellen) wurden stets mitgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, daß mit den Referenztestzellen bessere Resultate erzielt werden konnten als mit den

Testzellen der Blutsverwandten.

Schließlich wurde die Reproduzierbarkeit der HLA-Typisierung von Blutspuren anhand der Antigene HLA-A1, -A2, -B7, und -B8 geprüft, indem an einem Tag eine Doppeluntersuchung und an einem späteren Tag eine weitere Untersuchung an derselben Spur vorgenommen wurde. Die Ergebnisse wurden zueinander in Beziehung gesetzt und statistisch ausgewertet. Die Resultate der Drittuntersuchung zeigten spurenspezifisch entweder nur eine Erniedrigung oder nur eine Erhöhung der Antikörperabsorption, wobei es sich als statistisch hochsignifikant errechnete, daß diese gerichtete Änderung nur von der Spur abhängig war. Dieser gerichtete Fehler läßt sich aber nicht vorhersagen.

Die Untersuchungen zeigten, daß ein Nachweis von HLA-Antigenen in Blutspuren zwar prinzipiell möglich ist, die erforderliche Sicherheit mit der gewählten Untersuchungsmethode jedoch nicht erreicht wird.

Weitere Verbesserungen des Testsystems oder andere Testmethoden werden deshalb nötig sein, um die HLA-Typisierung von Blutspuren so zu vervollkommen, daß sie in die Routineuntersuchung eines kriminaltechnischen Labors aufgenommen werden kann.

14. LITERATURVERZEICHNIS

BENDER K (1978)

Das HLA-System.

Broschüre des Biotest-Serum Instituts GmbH,
Frankfurt/Main

BRINKMANN B (1969)

Bestimmung der Phosphoglucomutase-Typen aus
Blutspuren.

Z. f. gerichtl. Med. 66: 31

COOMBS R, BEDFORD D, ROUILLARD L (1956)

A and B Blood Group Antigens on Human Epidermal
Cells Demonstrated by Mixed Cell Agglutination.
Lancet 269: 461

DÖRR HM (1982)

Zur HLA-Typisierung von Blutspuren - Unter-
suchungen mit einem Absorptionstest.

Med. Diss. Erlangen

FIORI A (1957)

Un nuovo metodo per la diagnosi generica
die macchie di sangue.

Min. medicol. 77: 84

HODGE D, FESTENSTEIN H, WOLF E, LINCOLN R,
DODD B (1979)

Results from a preliminary study of the detec-
tion of HLA-antigens in blood stains.

Referate der 8. Intern. Tagung der Ges. f. forens.
Blutgruppenkunde e.V. S. 175

HOLZER F (1931)

Ein einfaches Verfahren zur Gruppenbestimmung
an vertrocknetem Blut durch Agglutininbindung.
Z. gerichtl. Med. 16: 445

HUMMEL K, SISTIG H, VOLK P (1977)

Zeitliche Dauer der Typisierbarkeit erythrozytärer
Enzyme (acP, GLO I, PGM 1, GPT, AK) in Blutspuren
- an Leinen angetrocknet in Abhängigkeit von der
Aufbewahrungstemperatur (RT, 4°, -20°, -180° C).
Referate der 7. Intern. Tagung der Ges. f. forens.
Blutgruppenkunde e.V.: 405

JOHANNSEN R (1979)

HLA-System.

Broschüre der Fa. Behring, Frankfurt/Main

JORCH G, OEPEN I (1977)

Nachweis der Faktoren Gm (1, 2, 4, 5, 21) und InV
(1) in menschlichen Sekreten: Speichel, Schweiß,
Nasensekret und Sperma.
Z. Rechtsmed. 79: 1

KUTZ N (1982)

Zur HLA-Typisierung von Blutspuren mit einem
Absorptionstest.
Med. Diss. Erlangen

LANDSTEINER K (1901)

Über Agglutinationserscheinungen normalen
menschlichen Blutes.
Wien. Klin. Woch. 14: 1132

LÖTTERLE J (1982)

HLA-Typisierung von Blutspuren. Ein Methodenvergleich
(Absorptions-Methode, Absorptions-Elutionsmethoden)
XII. Kongress der intern. Akademie f. gerichtl. und
soziale Medizin, Wien

MARTIN PD (1977)

A manual method for the detection of Rh antigens
in dried bloodstains.

J. forens. Sci. Soc. 17: 139

MAYR WR (1977)

Probleme bei der Anwendung des HLA-Systems
im Vaterschaftsgutachten.

Referate der 7. Intern. Tagung der Ges. f. forens.
Blutgruppenkunde e.V.: 417

MISCICKA D, DOBOSZ T, RASZEJA S (1977)

Determination of phenotypes of phosphoglucumutase
(PGM 1) in bloodstains by cellulose acetate
electrophoresis.

Z. Rechtsmed. 79: 297

NEWALL P (1979)

The identification of HLA-A2 and HLA-B5
antigens in dried bloodstains.

Can. Soc. Forens. Sci. J. 12: 1

PEREIRA M, DODD B, MARCHANT J (1969)

The Detection of A, B and H Group Specific Substances
in Stains from Body Fluids by Absorption-Elution and
Mixed Agglutination Techniques.

Med. Sci. Law 9: 116

POLITI M (1964)

Identificazione degli antigeni Rh su traccia ematica
con il metodo di assorbimento-eluzione.

Med. leg. (Genova) 12: 89

RITTNER C, WAIYAWUTH V (1974)

HL-A typing in dried bloodstains. I. Specificity and reliability of the inhibition test.

J. Immunogenet. 1: 99

RITTNER C, WAIYAWUTH V (1975)

HL-A typing in dried bloodstains. II. Comparative studies on microcytotoxicity and microcomplement fixation tests.

J. Immunogenet. 2: 211

ROTHWELL TJ, SAYCE J (1974)

The stability of PGM and AK isoenzymes in human tissues.

J. forens. Sci. Soc. 19: 590

SCHLEYER F, OEPEN I (1977)

Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspurenuntersuchung.

Schmidt-Römhild Lübeck, 2. Aufl.

SCHWERD W (1977)

Zum Beweiswert der MN-Differenzierung aus Blutspuren.

Referate der 7. Intern. Tagung der Ges. f. forens. Blutgruppenkunde e.V.: 335

TERASAKI P (1980)

Histocompatibility Testing.

UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling bin ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut, die Durchsicht der Arbeit sowie für die Übernahme des Referates außerordentlich zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. J. Lötterle danke ich für die Überlassung des Themas und seine tatkräftige und stets gerne gewährte Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Lebenslauf

Am 10.2.1956 wurde ich, Peter Zaar, als Sohn des Diplom-Ingenieurs Dr. Georg Zaar und Frau Hella Zaar, geb. Beier, als österreichischer Staatsbürger in Berlin geboren. Meine Grundschulausbildung erhielt ich an der Christoph-Földerich-Schule und an der 10. Grundschule, beide in Berlin. Danach besuchte ich die Dreilinden-Oberschule in Berlin (math.-naturwiss.), die Wöhlerschule in Frankfurt/M. (math.-naturwiss.) und das Gymnasium in Tutzing/Starnberger See (neusprachlich). Am 21.6.1975 beendete ich meine Schulzeit mit dem Abitur und begann im folgenden Wintersemester das Studium der Humanmedizin an der Universität Erlangen-Nürnberg. Am 4.11.1981 bestand ich dort das abschließende 3. Staatsexamen. Anschließend fand ich ab 1.1.1982 eine Anstellung als Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Rechtsmedizin in Erlangen bei Professor Dr. med. Wuermeling.

Während meines Studiums heiratete ich am 10.3.1978 die Medizinstudentin Bärbel Krause. Am 12.6.1979 kam unser erstes Kind Lisa, am 16.10.1981 unser zweites Kind Johannes zur Welt.

